

JP00/c 71470/018349

23.06.00

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 6月24日

REC'D 11 AUG 2000

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第178142号

WIPO

PCT

出願人
Applicant(s):

協和醗酵工業株式会社

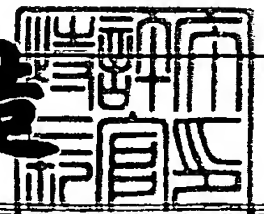
**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 7月28日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3058423

【書類名】 特許願

【整理番号】 H11-0874H1

【提出日】 平成11年 6月24日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 9/127

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醗酵工業株式
会社 医薬総合研究所内

【氏名】 加藤 泰己

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醗酵工業株式
会社 医薬総合研究所内

【氏名】 山内 雅博

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醗酵工業株式
会社 医薬総合研究所内

【氏名】 草野 宏子

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醗酵工業株式
会社 医薬総合研究所内

【氏名】 石原 淳

【特許出願人】

【識別番号】 000001029

【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

【代表者】 平田 正

~~【手数料の表示】~~

【予納台帳番号】 008187

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 リポソームに内包された薬物の漏出抑制方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 リポソームの脂質二重膜の枚数を複数枚以上とすることを特徴とする、生体成分存在下でのリポソームに内包された薬物の漏出抑制方法。

【請求項 2】 リポソームを構成する脂質として相転移温度が生体内温度より高い脂質を使用することを特徴とする、生体成分存在下でのリポソームに内包された薬物の漏出抑制方法。

【請求項 3】 リポソームの脂質二重膜の枚数を複数枚以上とすること、リポソームの平均粒子径を 1 2 0 n m 以上にすること、およびリポソームを構成する脂質として相転移温度が生体内温度より高い脂質を使用することの 3 つから選ばれる 2 つ以上を満たすことを特徴とする、生体成分存在下でのリポソームに内包された薬物の漏出抑制方法。

【請求項 4】 脂質が水素添加大豆ホスファチジルコリン、ポリエチレングリコール修飾リン脂質およびコレステロールから選ばれる少なくとも一成分以上からなる請求項 2 または 3 に記載の漏出抑制方法。

【請求項 5】 脂質がジステアロイルホスファチジルコリン、ポリエチレングリコール修飾リン脂質およびコレステロールから選ばれる少なくとも一成分以上からなる請求項 2 または 3 に記載の漏出抑制方法。

【請求項 6】 リポソームの脂質二重膜の枚数を複数枚以上とし、リポソームの平均粒子径を 1 2 0 n m 以上にすることを特徴とする、生体成分存在下でのリポソームに内包された薬物の漏出抑制方法。

【請求項 7】 リポソームの平均粒子径が 1 2 0 ~ 5 0 0 n m である請求項 3 または 6 に記載の漏出抑制方法。

【請求項 8】 生体成分が血液成分である請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の漏出抑制方法。

【請求項 9】 内包される薬物がインドロカルバゾール誘導体である請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の漏出抑制方法。

【請求項 1 0】 内包される薬物が制癌剤である請求項 1 ~ 8 のいずれかに

記載の漏出抑制方法。

【請求項 1 1】 内包される薬物が抗生物質である請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載の漏出抑制方法。

【請求項 1 2】 内包される薬物が薬理学的活性を有する物質である請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載の漏出抑制方法。

【請求項 1 3】 リポソームの脂質二重膜の枚数が複数枚以上であり、かつリポソームの平均粒子径が 1 2 0 n m 以上であるリポソーム製剤。

【請求項 1 4】 リポソームの脂質二重膜の枚数が複数枚以上であり、かつリポソームを構成する脂質が相転移温度が生体内温度より高い脂質であるリポソーム製剤。

【請求項 1 5】 リポソームの平均粒子径が 1 2 0 n m 以上であり、かつリポソームを構成する脂質が相転移温度が生体内温度より高い脂質であるリポソーム製剤。

【請求項 1 6】 リポソームの脂質二重膜の枚数が複数枚以上であること、リポソームの平均粒子径が 1 2 0 n m 以上であること、およびリポソームを構成する脂質が相転移温度が生体内温度より高い脂質であることの 3 つから選ばれる 2 つ以上を満たすリポソーム製剤。

【請求項 1 7】 生体成分存在下でリポソームに内包された薬物の漏出を抑制する請求項 1 3 ～ 1 6 のいずれかに記載のリポソーム製剤。

【請求項 1 8】 生体成分が血液成分である請求項 1 7 に記載のリポソーム製剤。

【請求項 1 9】 脂質が水素添加大豆ホスファチジルコリン、ポリエチレングリコール修飾リン脂質およびコレステロールから選ばれる少なくとも一成分以上からなる請求項 1 4 ～ 1 8 のいずれかに記載のリポソーム製剤。

【請求項 2 0】 脂質がジステアロイルホスファチジルコリン、ポリエチレングリコール修飾リン脂質およびコレステロールから選ばれる少なくとも一成分以上からなる請求項 1 4 ～ 1 8 のいずれかに記載のリポソーム製剤。

【請求項 2 1】 リポソームの平均粒子径が 1 2 0 ～ 5 0 0 n m である請求項 1 3、1 5 ～ 1 8 のいずれかに記載のリポソーム製剤。

【請求項 22】 内包される薬物がインドロカルバゾール誘導体である請求項 13～21 のいずれかに記載のリポソーム製剤。

【請求項 23】 内包される薬物が制癌剤である請求項 13～21 のいずれかに記載のリポソーム製剤。

【請求項 24】 内包される薬物が抗生物質である請求項 13～21 のいずれかに記載のリポソーム製剤。

【請求項 25】 内包される薬物が薬理学的活性を有する物質である請求項 13～21 のいずれかに記載のリポソーム製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、リポソームに内包された薬物の漏出抑制方法および生体内で安定なリポソーム製剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

リポソームに薬物を内包させて薬物の効果を高める技術はすでに医療現場で治療に使われており、臨床応用は主として注射により行われている。注射の中でもとりわけ血管内部に投与される場合、リポソームに内包された薬物が比較的長時間漏出することなくリポソーム内に存在することは、治療効果を高める上で重要である。ピーは、抗腫瘍剤のリポソームからの漏出を抑制する方法を見い出している（特許第 2572554 号公報）。これによると、リポソームの内外に帯電した物質の濃度勾配を作ることにより膜貫通ポテンシャルを発生させ、イオン化可能な薬物を pH 勾配や Na^+/K^+ 濃度勾配でリポソーム内部に封入することにより、薬物がリポソームから漏出するのを抑制する。さらに、同様な pH 勾配を利用して薬物をリポソームに内包し漏出を抑制する方法として、バレンホルツらは、硫酸アンモニウムを用いたアンモニウムイオン勾配により得られるリポソーム内外の pH 勾配の利用を考案した（特許第 2659136 号公報）。いずれの方法においても、用いるリポソームの粒子径に関する制約はなく、該リポソームは、小さなユニラメラ小胞（Small Unilamellar Vesicle）

le, SUV)、大きなユニラメラ小胞 (Large Unilamellar Vesicle, LUV)、多重ラメラ小胞 (Multilamellar Vesicle, MLV) などから構成されている。一方、マウラーらは、シプロフロキサシンを硫酸アンモニウムを用いた pH 勾配を利用した方法で平均粒子径が 190 nm の LUV に内包したとき、50% マウス血清中、37℃ の条件でシプロフロキサシンの漏出が速やかに起こることを報告している [バイオキミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ (Biochim. Biophys. Acta), 1374, 9 (1998)]。彼らは、シプロフロキサシンはドキソルビシンなどとは異なりリポソーム内部で結晶化 (precipitation) していないため漏出が起きるとしている。このように、前述の二つの特許で示される方法は、リポソームに内包された薬物の漏出を考えた場合必ずしも最良の方法とは言えず、さらなる改良が望まれている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、リポソームに内包された薬物の漏出抑制方法および生体内で安定なリポソーム製剤を提供することにある。

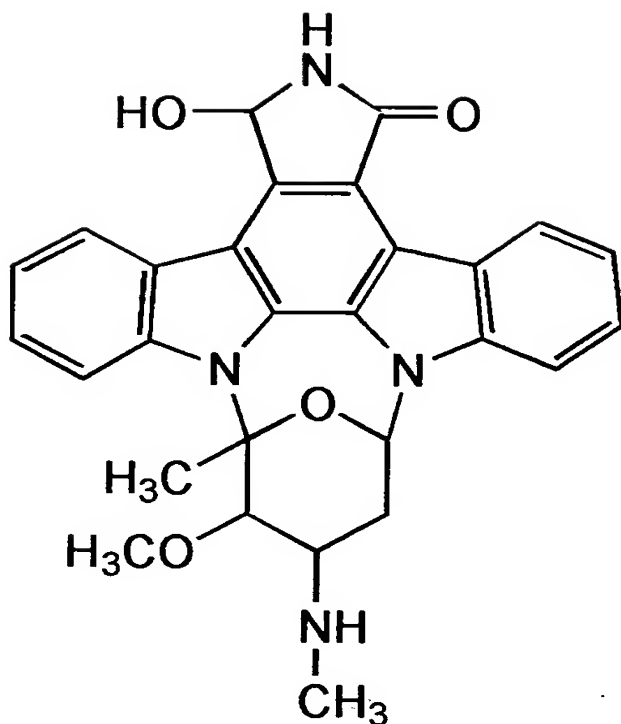
【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、UCN-01 などのインドロカルバゾール誘導体をリポソーム化することにより生体内における安定性の向上などが図られることを見い出している (WO97/48398)。

【0005】

【化 1】



UCN-01

【0006】

その後鋭意検討を重ねたところ、リポソームの平均粒子径を120nm以上とする、あるいは脂質二重膜の層の枚数を複数枚以上により、薬物漏出を効率良く抑制できることを見い出した。また、脂質二重膜の構成成分に相転移温度の高い成分を併用することにより薬物の漏出を抑制できることを見い出した。

【0007】

すなわち、本発明は、リポソームの脂質二重膜の枚数を複数枚以上とすることを特徴とする、生体成分存在下でのリポソームに内包された薬物の漏出抑制方法、~~またはリポソームを構成する脂質として相転移温度が生体内温度より高い脂質を使用することを特徴とする、生体成分存在下でのリポソームに内包された薬物の漏出抑制方法に関する。~~

【0008】

また、本発明は、リポソームの脂質二重膜の枚数を複数枚以上とすること、リポソームの平均粒子径を 1 2 0 n m 以上にするこゝ、およびリポソームを構成する脂質として相転移温度が生体内温度より高い脂質を使用することの 3 つから選ばれる 2 つ以上を満たすことを特徴とする、生体成分存在下でのリポソームに内包された薬物の漏出抑制方法に関する。

【0 0 0 9】

また、本発明は、リポソームの脂質二重膜の枚数を複数枚以上とし、リポソームの平均粒子径を 1 2 0 n m 以上にするこゝを特徴とする、生体成分存在下でのリポソームに内包された薬物の漏出抑制方法に関する。

【0 0 1 0】

また、本発明により、リポソームの脂質二重膜の枚数が複数枚以上であり、かつリポソームの平均粒子径が 1 2 0 n m 以上であるリポソーム製剤、リポソームの脂質二重膜の枚数が複数枚以上であり、かつリポソームを構成する脂質が相転移温度が生体内温度より高い脂質であるリポソーム製剤、またはリポソームの平均粒子径が 1 2 0 n m 以上であり、かつリポソームを構成する脂質が相転移温度が生体内温度より高い脂質であるリポソーム製剤が提供される。

【0 0 1 1】

さらに、本発明により、リポソームの脂質二重膜の枚数が複数枚以上であるこゝ、リポソームの平均粒子径が 1 2 0 n m 以上であるこゝ、およびリポソームを構成する脂質が相転移温度が生体内温度より高い脂質であるこゝの 3 つから選ばれる 2 つ以上を満たすリポソーム製剤が提供される。

【0 0 1 2】

上記各リポソーム製剤により、生体成分存在下でリポソームに内包された薬物の漏出が抑制される。

【0 0 1 3】

【発明の実施の形態】

リポソームを構成する脂質としては、例えばリン脂質、グリセロ糖脂質、スフィンゴ糖脂質、コレステロールなどが用いられ、特にリン脂質が好ましく用いられる。これらの中でも、相転移温度が生体内温度（3 5 ～ 3 7 ℃）より高いもの

が好ましい。これらの脂質は、ポリソルベート 80、プルロニック F 68 などの非イオン性界面活性剤、塩化ベンザルコニウムなどのカチオン性界面活性剤、ラウリル硫酸ナトリウムなどのアニオン性界面活性剤、デキストランなどの多糖類もしくはその誘導体、ポリオキシエチレンラウリルアルコール、ポリエチレングリコールなどのポリオキシエチレン誘導体などにより改質されていてもよい。

【0014】

リン脂質としては、例えばホスファチジルコリン（大豆ホスファチジルコリン、卵黄ホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリンなど）、ホスファチジルエタノールアミン（ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンなど）、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、ポリエチレングリコール修飾リン脂質、卵黄レシチン、大豆レシチン、水素添加リン脂質などの天然または合成のリン脂質などがあげられ、これらのうち相転移温度が生体内温度（35～37℃）より高いもの（例えばジステアロイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、N-ステアロイルスフィンゴミエリンなど）が好ましい。

【0015】

グリセロ糖脂質としては、例えばスルホキシリボシルグリセリド、ジグリコシルジグリセリド、ジガラクトシルジグリセリド、ガラクトシルジグリセリド、グリコシルジグリセリドなどがあげられ、これらのうち相転移温度が生体内温度（35～37℃）より高いもの（例えば 1, 2- α -ジパルミトイル-3- α - β -D-グルクロノシル-sn-グリセロール、1, 2- α -ジステアロイル-3- α - β -D-グルクロノシル-sn-グリセロールなど）が好ましい。

【0016】

また、~~スフィンゴ糖脂質としては、例えばガラクトシルセレブロシド、ラクトシルセレブロシド、ガングリオシドなどがあげられ、これらのうち相転移温度が生体内温度（35～37℃）より高いもの（例えばN-ステアロイルジヒドロガラクトシルスフィンゴシン、N-ステアロイルジヒドロラクトシルスフィンゴシ~~

ンなど) が好ましい。

【0017】

これらは、単独あるいは組み合わせて用いられる。組み合わせて用いる場合、例えば、水素添加大豆ホスファチジルコリン、ポリエチレングリコール修飾リン脂質およびコレステロールから選ばれる少なくとも二成分以上からなる脂質、ジステアロイルホスファチジルコリン、ポリエチレングリコール修飾リン脂質およびコレステロールから選ばれる少なくとも二成分以上からなる脂質などが、脂質として用いられる。ここで、ポリエチレングリコール修飾リン脂質におけるリン脂質としては、ジステアロイルホスファチジエタノールアミンなどのホスファチジエタノールアミンが好ましく用いられる。

【0018】

また、必要に応じて、脂質成分と共に、膜安定化剤としてコレステロールなどのステロール類など、抗酸化剤としてトコフェロールなど、荷電物質としてステアリルアミン、ジセチルホスフェート、ガンリオシドなどを用いてもよい。

【0019】

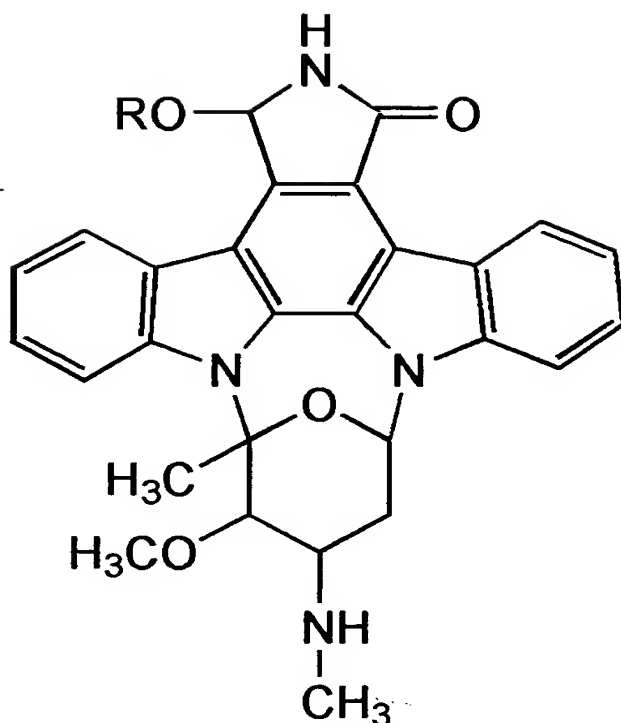
リポソームに内包される薬物としては、例えばインドロカルバゾール誘導体、制癌剤、抗生物質、抗真菌剤、薬理学的活性を有する物質などがあげられる。

【0020】

インドロカルバゾール誘導体としては、例えばUCN-01およびその誘導体など（例えば下記化合物）があげられる。

【0021】

【化2】



【0022】

(式中、Rは水素または低級アルキルを表す)

Rの定義における低級アルキルは、直鎖もしくは分枝状の炭素数1～6のアルキル、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシルなどを意味する。

【0023】

制癌剤としては、例えばアクチノマイシンD、マイトマイシンC、クロモマイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、ビノレルビン、ダウノルビシン、アクリルビシン、ブレオマイシン、ペプロマイシン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、エトポサイド、メソトレキセート、5-Fu、テガフル、シタラビン、~~エナシタビン、アンシタビン、タキソール、タキソデーレ、シスプラチン、シトシンアラビノシド、イリノテカン~~、およびこれらの誘導体などがあげられる。

【0024】

抗生物質としては、例えばミノサイクリン、テトラサイクリン、ピペラシリンナトリウム、トシル酸スルタミシリン、アモキシシリン、アンピシリン、バカンピシリン、アスポシシリン、セフジニル、フロモキシセフナトリウム、セフォチアム、セフカペンピボキシル、セファクロル、セフトレンピボシル、セファゾリンナトリウム、セフォゾラン、クラリスロマイシン、クリンダマイシン、エリスロマイシン、レボフロキサシン、トシル酸トスフロキサシン、オフロキサシン、シプロフロキサシン、アルベカシン、イセパマイシン、ジベカシン、アミカシン、ゲンタミシン、バンコマイシン、ホスホマイシン、およびこれらの誘導体などがあげられる。

【0025】

抗真菌剤としては、例えばフルコナゾール、イトラコナゾール、テルビナフィン、アムホテリシンB、ミコナゾール、およびこれらの誘導体などがあげられる。

【0026】

薬理学的活性を有する物質としては、例えばホルモン、酵素、蛋白、ペプチド、アミノ酸、核酸、遺伝子、ビタミン類、糖類、脂質、合成医薬品などがあげられる。

【0027】

生体成分としては、例えば血液成分などがあげられる。

【0028】

次に、本発明のリポソーム製剤の製造方法について説明する。

【0029】

本発明のリポソーム製剤の製造には、公知のリポソーム製剤の調製方法が適用できる。公知のリポソーム製剤の調製方法としては、例えばバンハム (Bangham) らのリポソーム調製法 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジ (J. Mol. Biol.), 13, 238 (1965)]、エタノール注入法 [ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー (J. Cell. Biol.), 6, 621 (1975)]、フレンチプレス法 [フェブス・レター (FEB S Lett.) 99, 210 (1979)]、凍結融解法 [アーカイブス・オブ・

バイオケミストリー・アンド・バイオフィジックス (Arch. Biochem. Biophys.), 212, 186 (1981)], 逆相蒸発法 [プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・ユー・エス・エー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75, 4194 (1978)], pH勾配法 (特許第2572554号公報、特許第2659136号公報など) などがあげられる。

【0030】

pH勾配法は、リポソームへの薬物の内包率が高いこと、リポソーム懸濁液中の残留有機溶媒が少ないことなどの利点が多い。例えば、脂質をエタノールなどの溶媒に溶解後、なす型フラスコに入れ、減圧下溶媒留去し、脂質薄膜を形成する。次いで、酸性緩衝液 (例えばクエン酸緩衝液) を加えて振とうし、大きなMLVを形成する。さらに、エクストルージョン法などにより、リポソームの平均粒子径を調製する (例えば130nm)。このリポソーム懸濁液にUCN-01などの薬物の弱酸性液を添加後、適当なpH調整剤 (例えば水酸化ナトリウム水溶液) を加え、リポソーム懸濁液のpHを中性付近まで上昇 (リポソーム懸濁液のpH上昇前とpH上昇後のpHの差は3以上が望ましい) させる。以上の操作により、リポソーム内部に薬物を定量的に包含させることができる。

【0031】

また、非イオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤、多糖類およびその誘導体、ポリオキシエチレン誘導体などによるリポソーム表面改質も任意に行うことができる [Stealth Liposomes, ed. by D. D. Lasic and F. Martin, CRC Press Inc., Florida, pp. 93-102, 1995年]。さらに、ターゲティングに応用するため、抗体、蛋白、ペプチド、脂肪酸類などによるリポソーム表面修飾を行うこともできる [Stealth Liposomes, ed. by D. D. Lasic and F. Martin, CRC Press Inc., Florida, pp. 93-102, 1995年]。

【0032】

リポソームを懸濁させる溶液としては、水以外に酸、アルカリ、種々の緩衝液

、生理的食塩液、アミノ酸輸液などを用いてもよい。また、クエン酸、アスコルビン酸、システイン、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）などの抗酸化剤をリポソーム懸濁液に添加してもよい。また、等張化剤として、例えば、グリセリン、ブドウ糖、塩化ナトリウムなどの添加も可能である。

【0033】

また、薬物と脂質とをエタノールなどの有機溶媒に溶解し、溶媒留去した後、生理食塩水などを添加、振とう攪拌し、リポソームを形成させることもできる。

【0034】

リポソームの平均粒子径は、120nm以上であることが好ましく、120～500nmであることがさらに好ましい。平均粒子径を調節する方法としては、上述のエクストルージョン法などがあげられる。

【0035】

脂質二重膜の枚数を複数枚以上とする方法としては、0.2 μ m、0.4 μ mあるいはそれ以上の大きめの孔を有するメンブランフィルターを用いたエクストルージョン法、大きなMLVを機械的に粉砕（マントンゴウウリン、マイクロフルイダイザーなどを使用）する方法〔R. H. Muller, S. Benita, B. Bohm編著, "Emulsion and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs", High-Pressure Homogenization Techniques for the Production of Liposome Dispersions: Potential and Limitations, M. Brandl, pp. 267-294, 1998 (Scientific Publishers Stuttgart, Germany)〕などがあげられる。

【0036】

上記の方法などにより得られるリポソーム製剤は、そのままで使用できるが、使用目的、保存条件などにより、マンニトール、ラクトース、グリシンなどの賦形剤を加えて凍結乾燥することもできる。また、グリセリンなどの凍結保存剤を加えて凍結保存してもよい。

【0037】

本発明で得られるリポソーム製剤は、注射剤として用いるのが一般的であるが、経口剤、点鼻剤、点眼剤、経皮剤、坐剤、吸入剤などとして加工して使用することもできる。

【0038】

本発明で得られるリポソーム製剤は、生体成分中、例えば血液成分中での薬物の安定化、副作用の低減および腫瘍への集積性の増大を目的としている。

【0039】

次に、試験例により、本発明の効果について説明する。

試験例 1

ヒトAGP添加ラットプラズマ中（ヒトAGP 0.5 mg/mL）におけるリポソーム内に包含したUCN-01の経時的な漏出を調べるため、実施例1～4および比較例1～3で調製したUCN-01包含リポソーム懸濁液0.1 mLに蒸留水0.9 mLを加えて混合した。この液0.05 mLにヒトAGPを0.5 mg/mL添加したラットプラズマ4.95 mLを加えて混合し、試料液とした。混合直後、および37℃で3時間保存した後、試料液2 mLをゲル濾過（Sephacrose CL-6B、φ20mm×20cm、移動相：PBS（リン酸緩衝食塩水）、試料添加量：2 mL、フラクション採取量：約4 mL）した。リポソーム画分と蛋白画分を分離し、溶出液0.4 mL当たり2-プロパノールを0.8 mL加えて振とうした。その後、4℃下、12,000 g×10分の遠心分離を行い、上清20 μLを下記の条件で高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分析した。

【0040】

HPLC分析条件

カラム：YMC-Pack ODS-AMAM-312150 mm×6 mm（YMC）

移動相：0.1%トリエチルアミン添加0.05 mol/Lリン酸緩衝液（pH 7.3）：アセトニトリル＝1容量部：1容量部

流速：1.0 mL/分

カラム保持温度：25℃

検出：励起波長 310 nm、蛍光波長 410 nm

【0041】

リボソーム中の UCN-01 残存率は、まず、リボソーム画分中の UCN-01 含有率を求め、ゲル濾過の回収（リボソーム画分中と蛋白画分中の UCN-01 の合計）率 $[(A+B)/C]$ で補正することにより、算出した。

【0042】

【数 1】

リボソーム画分中の UCN-01 含有率 (%) = $(A \div C) \times 100$

蛋白画分中の UCN-01 含有率 (%) = $(B \div C) \times 100$

【0043】

A：リボソーム画分中の UCN-01 量

B：蛋白画分中の UCN-01 量

C：ゲル濾過に供したリボソーム懸濁液中の UCN-01 量

【0044】

【数 2】

リボソーム中の UCN-01 残存率 (%)

= リボソーム画分中の UCN-01 含有率 (%) \div 回収率 (%) $\times 100$

【0045】

結果を表 1 に示す。

【0046】

【表 1】

表 1 : リポソーム中の UCN-01 残存率

		UCN-01 残存率 (%)
実施例 1	混合直後	95
	3 時間後	80
実施例 2	混合直後	91
	3 時間後	57
実施例 3	混合直後	94
	3 時間後	63
実施例 4	混合直後	99
	3 時間後	81
比較例 1	混合直後	90
	3 時間後	37
比較例 2	混合直後	23
	3 時間後	0
比較例 3	混合直後	93
	3 時間後	5

【0047】

以下に、本発明の実施例および比較例を示す。

【0048】

【実施例】

実施例 1

5 g の水素添加大豆ホスファチジルコリン {相転移温度 : 58℃ [FEBS

Let t. , 386, 247-251 (1996)]} に、25 mL の 100 m

mol/Lクエン酸緩衝液 (pH 4.0) を加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を、70℃で0.4μmのポリカーボネートメンブランフィルターを10回通過させた。これに100mmol/Lのクエン酸緩衝液を加え、水素添加大豆ホスファチジルコリンの濃度が62.5mg/mLのリポソーム懸濁液となるよう調製した。一方、10mgのUCN-01を量り取り、先に調製したリポソーム懸濁液8mLを添加した。さらに、1mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液を適量添加してpHを8にした後、蒸留水を加えて全量を10mLとした。70℃で5分間加熱し、UCN-01をリポソーム内に包含した。

【0049】

動的光散乱 (DLS) [A model DLS-700, Otsuka Electronics Ltd. (DLS-700、大塚電子)、以下同様] でリポソームの平均粒子径を測定したところ、186nmであった。

【0050】

実施例 2

5gの水素添加大豆ホスファチジルコリン {相転移温度: 58℃ [FEBS Lett., 386, 247-251 (1996)]} に、25mLの100mmol/Lのクエン酸緩衝液 (pH 4.0) を加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を、70℃で0.4μmのポリカーボネートメンブランフィルターを2回通過させた。さらに70℃で0.2μmのポリカーボネートメンブランフィルターを10回通過させた。これに100mmol/Lのクエン酸緩衝液を加え、水素添加大豆ホスファチジルコリンの濃度が62.5mg/mLのリポソーム懸濁液を調製した。一方、10mgのUCN-01を量り取り、先に調製したリポソーム懸濁液8mLを添加した。さらに、1mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液を適量添加してpHを8にした後、蒸留水を加えて全量を10mLとした。70℃で5分間加熱し、UCN-01をリポソーム内に包含した。

DLSでリポソームの平均粒子径を測定したところ、130nmであった。

【0051】

実施例 3

実施例 2 で調製した UCN-01 を含むリポソーム懸濁液 5 mL に、1.25 g/mL の濃度の PEG-DSPE [1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロール-3-ホスファチジルエタノールアミン-N-(ポリエチレングリコール 2000); Avanti 製] のエタノール溶液を 0.05 mL 添加した後、70℃で 2 分間加熱し、リポソーム表面をポリエチレングリコール (PEG) で被覆した。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、136 nm であった。

【0052】

実施例 4

0.7 g のジステアロイルホスファチジルコリン [DSPC、相転移温度：58℃および 56℃ (野島庄七他編、リポソーム、p. 77、1988 年、南江堂)] に、約 5 mL の 100 mmol/L クエン酸緩衝液 (pH 4.0) を加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を、70℃で 0.4 μm のポリカーボネートメンブランフィルターを 10 回通過させた。さらに、70℃で 0.2 μm のポリカーボネートメンブランフィルターを 10 回通過させた。これに 100 mmol/L のクエン酸緩衝液を加え、DSPC の濃度が 62.5 mg/mL のリポソーム懸濁液となるよう調製した。一方、5 mg の UCN-01 を量り取り、先に調製したリポソーム懸濁液 4 mL を添加した。さらに、1 mol/L の水酸化ナトリウム水溶液を適量添加して pH を 8 にした後、蒸留水を加えて全量を 5 mL とした。70℃で 5 分間加熱し、UCN-01 をリポソーム内に包摂した。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、180 nm であった。

【0053】

比較例 1

20 g の水素添加大豆ホスファチジルコリン {相転移温度：58℃ [FEBS Lett., 386, 247-251 (1996)]} に、70 mL の 100 mmol/L クエン酸緩衝液 (pH 4.0) を加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を、70℃で 0.4 μm のポリカーボネートメンブランフィルターを 4 回通過させた。さらに 70℃で 0.1 μm のポリカーボネートメン

ブランフィルターを10回通過させた。これに100mmol/Lのクエン酸緩衝液を加え、水素添加大豆ホスファチジルコリンの濃度が62.5mg/mLのリポソーム懸濁液となるよう調製した。一方、20mgのUCN-01を量り取り、先に調製したリポソーム懸濁液16mLを添加した。さらに、1mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液を添加してpHを8にした後、蒸留水を加えて全量を20mLとした。70℃で5分間加熱し、UCN-01をリポソーム内に包含した。これを氷で冷却した後、UCN-01を含むリポソーム懸濁液1.6mLを取り、これに蒸留水6.4mLを加えた。超遠心分離操作（25℃、110,000g×1時間）を行い、上清6.7mLを除去した後、蒸留水を加えてUCN-01の濃度が1mg/mLとなるよう再懸濁した。

DLSでリポソームの平均粒子径を測定したところ、109nmであった。

【0054】

比較例2

15gの卵黄ホスファチジルコリン〔EggPC、相転移温度：-15~-7℃（野島庄七他編、リポソーム、p.77、1988年、南江堂）〕に、75mLの100mmol/Lクエン酸緩衝液（pH4.0）を加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を、室温で0.4μmのポリカーボネートメンブランフィルターを10回通過させた。これに100mmol/Lのクエン酸緩衝液を加え、EggPCの濃度が62.5mg/mLのリポソーム懸濁液となるよう調製した。一方、5mgのUCN-01を量り取り、先に調製したリポソーム懸濁液4mLを添加した。さらに、1mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液を適量添加してpHを8にした後、蒸留水を加えて全量を5mLとした。室温で、UCN-01をリポソーム内に包含した。

DLSでリポソームの平均粒子径を測定したところ、274nmであった。

【0055】

比較例3

1. 1gのジパルミトイルホスファチジルコリン〔DPPC、相転移温度：41℃および35℃（野島庄七他編、リポソーム、p.77、1988年、南江堂）〕に、約7mLの100mmol/Lクエン酸緩衝液（pH4.0）を加え、

ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を、55℃で0.4 μ mのポリカーボネートメンブランフィルターを15回通過させた。さらに、55℃で0.2 μ mのポリカーボネートメンブランフィルターを10回通過させた。これに100mmol/Lのクエン酸緩衝液を加え、DPPCの濃度が62.5mg/mLのリポソーム懸濁液となるよう調製した。一方、5mgのUCN-01を量り取り、先に調製したリポソーム懸濁液4mLを添加した。さらに、1mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液を適量添加してpHを8にした後、蒸留水を加えて全量を5mLとした。55℃で5分間加熱し、UCN-01をリポソーム内に包合した。

DLSでリポソームの平均粒子径を測定したところ、179nmであった。

【0056】

【発明の効果】

本発明により、リポソームに内包された薬物の漏出抑制方法および生体内で安定なリポソーム製剤が提供される。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 リポソームに内包された薬物の漏出抑制方法および生体内で安定なリポソーム製剤を提供すること。

【解決手段】 リポソームの脂質二重膜の枚数を複数枚以上とすること、リポソームの平均粒子径を 1 2 0 n m 以上にすること、およびリポソームを構成する脂質として相転移温度が生体内温度より高い脂質を使用することの 3 つから選ばれる 2 つ以上を満たすことを特徴とする、生体成分存在下でのリポソームに内包された薬物の漏出抑制方法、およびリポソームの脂質二重膜の枚数が複数枚以上であること、リポソームの平均粒子径が 1 2 0 n m 以上であること、およびリポソームを構成する脂質が相転移温度が生体内温度より高い脂質であることの 3 つから選ばれる 2 つ以上を満たすリポソーム製剤を提供する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001029]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
氏 名 協和醗酵工業株式会社